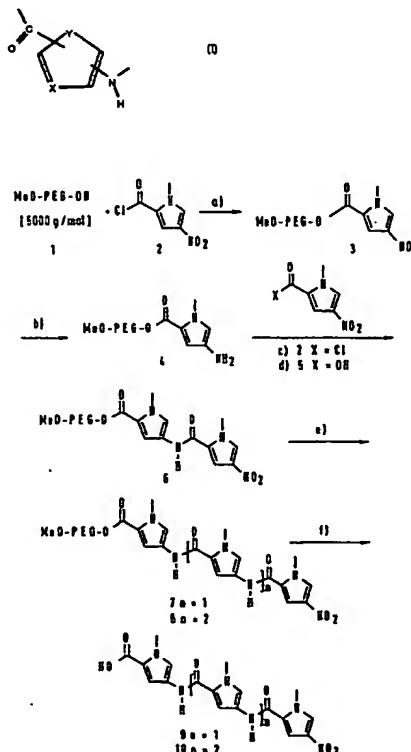




(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/10, C07D 207/42, 207/34, B01D 15/08, C07H 21/00, 1/08		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/41367 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. August 1999 (19.08.99)
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/00580</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 29. Januar 1999 (29.01.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 05 431.9 11. Februar 1998 (11.02.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MERCK PATENT GMBH [DE/DE]; Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BUCHHOLZ, Herwig [DE/DE]; Auf dem Mühlberg 75, D-60599 Frankfurt (DE). SCHULTE, Michael [DE/DE]; Im Großen Ramsee 20, D-65428 Rüsselsheim (DE). KÖNIG, Burkhard [DE/DE]; Altewiekring 18, D-38102 Braunschweig (DE).</p> <p>(74) Gemeinsamer Vertreter: MERCK PATENT GMBH; Postfach, D-64271 Darmstadt (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	
<p>(54) Title: HETEROAROMATIC OLIGOAMIDES AS AFFINITY LIGANDS</p> <p>(54) Bezeichnung: HETEROAROMATISCHE OLIGOAMIDE ALS AFFINITÄTSLIGANDEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to chromatographic separating media for the separation of nucleic acids, comprising a base carrier and an affinity ligand, which ligand contains a heteroaromatic rest of the formula (I), where X is -CH= or -N= and Y is -NCH₃- or -O-. The invention also relates to a synthesis pathway for producing heteroaromatic oligoamides, in which the heteroaromatic amide units are introduced into a polymer support in the form of nitrated heteroaromatic carbonic acid derivatives without the need for protective groups.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft chromatographische Trennmaterialien für die Trennung von Nukleinsäuren umfassend einen Basisträger und einen Affinitätsligand, wobei der Affinitätsligand einen heteroaromatischen Rest der Formel (I) enthält, worin X - CH= oder -N= und Y -NCH₃- oder -O- bedeuten. Weiterhin wird ein Syntheseweg für die Herstellung von heteroaromatischen Oligoamiden offenbart, bei dem an einem polymeren Träger die heteroaromatischen Amideinheiten als nitrierte heteroaromatische Carbonsäurederivate eingeführt werden, ohne daß Schutzgruppen vonnöten wären.</p>			



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Heteroaromatische Oligoamide als Affinitätsliganden

Die Erfindung betrifft die Verwendung von heteroaromatischen Oligoamiden als Affinitätsliganden in der Chromatographie, sowie besonders
5 bevorzugte Verfahren zur Herstellung von heteroaromatischen Oligoamiden.

Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten und für die Abreicherung von
DNA aus biologischen Präparaten stehen bisher nur wenige Affinitäts-
10 liganden zur Verfügung. Es wurde gefunden, daß heteroaromatische
Oligoamide als Affinitätsliganden für die affinitätschromatographische
Trennung von DNA geeignet sind.

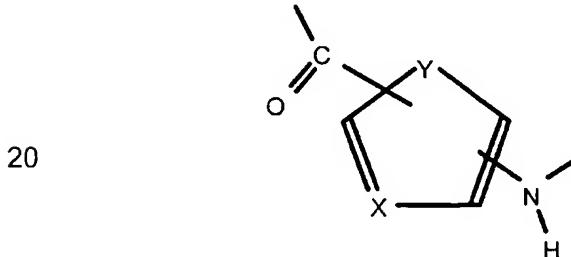
Heteroaromatische Oligoamide gehören zu den Verbindungsklassen, die
15 an DNA binden (D.S. Johnson und D.L. Boger (1996) in *Comprehensive Supramolecular Chemistry*; Pergamon). Weitere Anwendungsmöglichkeiten dieser Verbindungsklasse sind ebenfalls bekannt; dazu gehören die
Verwendung als Modellsubstanzen bei der sequenzspezifischen DNA-
Erkennung, Verwendung als Regulationsfaktoren in der Molekularbiologie
20 oder als genspezifische Pharmaka. Heteroaromatische Oligoamide sind
durch Peptidbindungen zwischen Aminocarbonsäuren, die einen hetero-
aromatischen Kern aufweisen, gekennzeichnet. Synthesen für diese Ver-
bindungsklasse sind ebenfalls bekannt. Jedoch sind bisher beschriebene
Synthesewege, wie z.B. der von E.E. Baird und P.B. Dervan (1996) in *J.
25 Am. Chem. Soc.* 118, Seiten 6141 - 6146, beschriebene, wegen der
zusätzlichen Schutzgruppenchemie äußerst aufwendig. Für die Bereit-
stellung eines Affinitätsliganden sollten jedoch möglichst einfache
Synthesewege zur Verfügung stehen.

30 Es besteht also die Aufgabe, Trennmaterialien für die Affinitätschromato-
graphie von Nukleinssäuren bereitzustellen. Um diese Aufgabe möglichst
wirtschaftlich zu lösen, besteht insbesondere die zusätzliche Aufgabe, ein-

fache Synthesewege ohne Schutzgruppenchemie für heteroaromatische Oligoamide bereitzustellen.

Es wurde gefunden, daß ausgehend von nitrierten heteroaromatischen
 5 Carbonsäurederivaten heteroaromatische Oligoamide mittels Festphasen-
 synthese synthetisiert werden können, ohne daß Schutzgruppen eingeführt
 werden müssen. Somit können bekannte oder auch neue hetero-
 aromatische Oligoamide in einfacher Weise bereitgestellt werden; diese auf
 verbesserten Synthesewegen zugänglichen Verbindungen stehen
 10 insbesondere auch als Affinitätsliganden zur Verfügung.

Gegenstand der Erfindung sind chromatographische Trennmaterialien für
 die Trennung von Nukleinsäuren umfassend einen Basisträger und einen
 Affinitätsliganden, wobei der Affinitätsligand einen heteroaromatischen
 15 Rest der Formel I enthält,

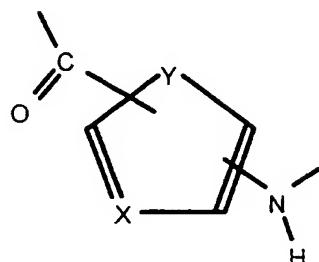


worin

25 X -CH= oder -N= und Y -NCH₃- oder -O- bedeuten. Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung dieser Trennmaterialien für die chromatographische Trennung von Nukleinsäuren.

Gegenstand der Erfindung sind Verfahren zur Herstellung von heteroaromatischen Oligoamiden, die einen heteroaromatischen Rest der Formel I enthalten,

5



10

I

worin

X -CH= oder -N=

und

15 Y -NCH3- oder -O-

bedeuten, wobei folgende Verfahrensschritte ausgeführt werden:

- a) Bindung einer heteroaromatischen Nitrocarbonsäureeinheit an einen polymeren Träger, wobei die erzeugte Bindung unter Bedingungen gespalten werden kann, bei denen Amidbindungen intakt bleiben;
- 20 b) Reduktion der Nitrogruppe der an den polymeren Träger gebundenen heteroaromatischen Nitrocarbonsäure zu einer Aminogruppe;
- c) Bindung einer weiteren heteroaromatischen Nitrocarbonsäureeinheit an die in Schritt b) entstandenen Aminogruppe, wobei dieselbe heteroaromatische Nitrocarbonsäureeinheit wie im Schritt a) oder eine 25 heteroaromatische Nitrocarbonsäureeinheit mit anderer Struktur eingeführt wird;
- d) Wiederholung der Schritte b) und c) bis die gewünschte Kettenlänge und Sequenz erzielt ist;
- 30 e) optionale Derivatisierung der zuletzt eingeführten Nitro- oder Amino- gruppe;

- f) Ablösung des heteroaromatischen Oligoamids vom polymeren Träger;
- g) optionale Umsetzung der in Schritt f) entstandenen Carboxylgruppe.

5 Abbildung 1 zeigt beispielhaft das erfindungsgemäße Syntheseschema. Einzelheiten finden sich in den Beispielen. Die Abbildungen 2 und 3 zeigen einige Beispiele für heteroaromatische Oligoamide, wie sie durch das erfindungsgemäße Verfahren erhalten werden können. Abbildung 4 zeigt, wie die Kettenverlängerung durch ^1H -NMR-Messung verfolgt werden
10 kann.

Peptidsynthesen an Festphasen sind unter der Bezeichnung Merrifield-Synthese bekannt. Als Träger dient dabei ein unlösliches Harz. Dieses Verfahren wird in vielen Varianten verwendet, beispielsweise werden
15 unterschiedliche Trägermaterialien oder Di- oder Tripeptide anstelle von einzelnen Aminosäuren benutzt. Eine weitere Variante dieser Synthese, bei der ein gelöstes Polymer (z.B. Polyethylenglykol) als Träger dient, wurde von M. Mutter et al. (1971) *Angew.Chem* **83**, Seite 883 - 884 beschrieben.

20 Es wurde gefunden, daß unter Verwendung von polymeren Trägern auf der Grundlage von nitrierten heteroaromatischen Carbonsäurederivaten heteroaromatische Oligoamide in einfacher Weise zugänglich sind. Dabei können in die Oligoamidkette auch Monomereinheiten aus abweichenden
25 Verbindungsklassen wie aliphatische oder aromatischen Aminocarbonsäuren oder wie Sulfonamid- oder Harnstoffderivate eingefügt sein; Beispiele sind unter den Ziffern 2-12, 2-13 und 2-14 in Abbildung 2, sowie unter den Ziffern 3-13 und 3-15 in Abbildung 3 gegeben. Unter den erfindungsgemäßen Begriff heteroaromatische Polyamide fallen somit auch
30 Verbindungen, die teilweise auch Untereinheiten enthalten, die einen aromatischen Kern aufweisen, und/oder deren Peptidbindung sich von einer Sulfonsäureamid- oder einer Harnstoffgruppierung ableitet, wobei der

Anteil dieser abweichenden Strukturelemente nicht mehr als die Hälfte der Anzahl der Monomereinheiten beziehungsweise Strukturelemente betrifft.

Als polymere Träger können sowohl unlösliche Polymerisate, z.B. vernetzte
5 DIOL- oder epoxidmodifizierte Poly(met)acrylate oder derivatisierte anorganische Materialien, wie z.B. DIOL- oder epoxidmodifiziertes Kieselgel, oder auch lösliche Polymerisate, wie z.B. Polyethylenglykolderivate, verwendet werden. Alle diese Varianten werden erfindungsgemäß als Festphasensynthesen an polymeren Trägern zusammengefaßt. In einer ersten Stufe
10 wird als erste Monomereinheit die erste nitrierte heteroaromatische Carbonsäureeinheit (kurz: Nitrocarbonsäureeinheit) an den Träger gebunden. Diese Bindung kann direkt oder über einen spacer erfolgen; die Verwendung von spacern ist von D.J. Gravert und K.D. Janda (1997) beschrieben (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, Seiten 6419 - 6423). Als
15 spacer können beispielsweise α - ω -Diamine, wie z.B. Ethylen diamin oder 1,6-Diaminohexan, sowie ω -Aminocarbonsäuren oder ω -Hydroxycarbonsäuren verwendet werden. Als polymerer Träger wird insbesondere Methoxypolyethylenglykol, insbesondere mit einem Molekulargewicht von
20 10^3 bis 10^4 bevorzugt.

Für die Bindung der ersten Monomereinheit stehen dem Fachmann
bekannte Reaktionsketten zur Verfügung: So kann ein Säurechlorid einer
25 nitrierten heteroaromatischen Carbonsäure mit einer aliphatischen Hydroxylgruppe auf dem polymeren Träger zur Reaktion gebracht werden. Außerdem ist es beispielsweise möglich, eine nitrierte heteroaromatische Carbonsäure durch Reaktion mit wasserabspaltenden Agentien, wie z.B. Dicylclohexylcarbodiimid, oder durch die Aktivierung der Hydroxylgruppe oder der Carboxylgruppe an den polymeren Träger zu binden. Geeignete Reaktionen und die notwendigen Reaktionsbedingungen sind beispielsweise aus der Peptidchemie bekannt und in gängigen Handbüchern dieses
30 Fachgebietes beschrieben.

Im folgenden Reaktionsschritt wird die Nitrogruppe zu einer Aminogruppe reduziert. Geeignete Reduktionsmethoden sind dem Fachmann bekannt. Bevorzugt wird die katalytische Reduktion mit Ammoniumformiat in Gegen-
5 wart von Palladium ($\text{NH}_4\text{HCO}_2/\text{Pd/C}$ in CH_2Cl_2 :Methanol). Nach Abtrennung des Katalysators durch Filtration kann das polymergebundene Amin durch Zugabe von Ether ausgefällt werden und in CH_2Cl_2 gelöst werden, wobei überschüssiges NH_4HCO_2 im Rückstand verbleibt.

10 Anschließend kann die nächste Monomereinheit eingefügt werden, wobei für die Bildung der Peptidbindung die oben bereits genannten Vorgehensweisen zur Verfügung stehen. Die Nitrogruppe der neu eingefügten Monomereinheit wird wiederum wie bereits im vorgehenden beschrieben zur Aminogruppe reduziert. Diese Reaktionsfolgen können wiederholt werden,
15 bis das Reaktionsprodukt die gewünschte Länge aufweist. Durch Auswahl der Monomereinheiten kann die gewünschte Sequenz erzielt werden. Dabei können neben verschiedenen nitrierten heterocyclischen Carbonsäuren auch aromatische Nitrosulfonylchloride oder Nitroisocyanate oder andere Aminocarbonsäuren eingesetzt werden, wobei die oben genannten
20 Sequenzvariationen erzeugt werden. Die Kettenverlängerung durch den Einbau der Monomereinheiten kann durch NMR-Messung verfolgt werden.

25 Die Nitrogruppe der letzten Monomereinheit kann nach bekannten Verfahren weiter umgesetzt werden; es ist ebenfalls möglich als Monomereinheit eine Carbonsäure ohne Nitrogruppe zu verwenden.

30 Die für das erfindungsgemäße Verfahren benötigten nitrierten (hetero)-aromatischen Carbonsäuren und deren Derivate sind kommerziell erhältlich oder nach Standardmethoden der organischen Synthese zugänglich.

Falls gewünscht, kann das erzeugte heteroaromatische Oligoamid vom polymeren Träger nach bekannten Methoden, z.B. hydrolytisch, abgespal-

ten werden. Anschließend kann das freigesetzte heteroaromatische Oligoamid gegebenenfalls weiter umgesetzt werden, z.B. indem man eine spacer-Gruppierung einführt, oder indem man das heteroaromatische Oligoamid direkt an einen chromatographischen Basisträger bindet. Falls 5 der polymere Träger als Basisträger für die Chromatographie geeignet ist, kann das heteroaromatische Oligoamid auch auf dem polymeren Träger verbleiben und das Produkt direkt als chromatographisches Trennmaterial Verwendung finden.

10 Unter dem Begriff Basisträger für die Chromatographie werden Materialien verstanden, auf deren Grundlage chromatographische Trennmaterialien bereitgestellt werden können; dazu gehören beispielsweise: vernetzte organische Polymere, wie Styrol-Divinylbenzol-Copolymerisate oder wie Copolymerisate auf der Grundlage von Poly(meth)acrylaten, Polysaccharide und deren Derivate, Kieselgele und deren Derivate. Basisträger können sowohl porös mit in der Chromatographie üblichen Porenweiten als auch unporös vorliegen. Basisträger können außerdem in partikulärer Form mit in der Chromatographie üblichen Abmessungen, aber auch in nicht-partikulärer Form beispielsweise als säulenförmige Formkörper oder 15 Membranen, vorliegen. Derartige Materialien sind dem Fachmann bekannt und deren Eigenschaften und Verwendung in Handbüchern beschrieben. Viele geeignete Materialien sind zudem kommerziell erhältlich. Die chromatographischen Trennmaterialien entsprechend der vorliegenden Erfindung werden für die Affinitätschromatographie eingesetzt 20 und enthalten deswegen heteroaromatische Oligoamide als Affinitätsliganden, die für die Wechselwirkung zwischen dem Analyten und dem chromatographischen Trennmaterial verantwortlich sind.

25 In Abbildung 1 ist eine Reaktionsfolge in zwei Varianten beispielhaft 30 dargestellt: Methoxypolyethylenglycol (MeO-PEG-OH) mit einem mittleren Molekulargewicht von 5000 diente als polymerer Träger. Durch Umsetzung mit 1-Methyl-4-nitro-1H-pyrrol-2-carbonylchlorid (1) mit MeO-

PEG-OH unter Standardbedingungen wird die erste heterocyclische Monomereinheit in Esterbindung eingeführt (Reaktionsschritt a)). Die Bindungskapazität des polymeren Trägers beträgt für die erste heterocyclische Monomereinheit ca. 2,5 g/100 g Träger. Anschließend wird die Nitrogruppe mit $\text{NH}_4\text{HCO}_2/\text{Pd/C}$ in CH_2Cl_2 :Methanol (1:8; v:v) bei Raumtemperatur innerhalb einer Stunde zur Aminogruppe reduziert (Reaktionsschritt b)). Der feste Katalysator wird abfiltriert. Das an den polymeren Träger gebundene Amin wird anschließend mit Diethylether ausgefällt. Anschließend wird das an den polymeren Träger gebundene Amin mit CH_2Cl_2 gelöst und kann für den nächsten Kopplungsschritt verwendet werden; überschüssiges NH_4HCO_2 bleibt zurück. Für den nächsten Kopplungsschritt kann das Säurechlorid (2) in Gegenwart von Pyridin zur Reaktion gebracht werden (Reaktionsschritt c)). Es ist an dieser Stelle auch möglich, statt des Säurechlorides (2) die freie Säure (5) einzusetzen und diese mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC/HOBt) an die Aminogruppe zu binden (Reaktionsschritt d)). Durch die Wiederholung des Reduktions- und des Kopplungsschrittes werden Trimere und Tetramere erhalten (Reaktionsschritt e)). Nachdem gewünschte Sequenz und Kettenlänge erreicht sind, wird das heteroaromatische Oligoamid durch Alkalibehandlung hydrolytisch vom polymeren Träger abgespalten (Reaktionsschritt f)).

In den Abbildungen 2 und 3 sind beispielhaft einige weitere heteroaromatische Oligoamide dargestellt, wie sie durch das erfindungsgemäße Verfahren auf einfache Weise zugänglich sind. In den Abbildungen 2 und 3 bedeuten:

R MeO-PEG-O- oder HO-
X -CH= oder -N=
n 1, 2 oder 3

30

Auch ohne weitere Ausführungen wird davon ausgegangen, daß ein Fachmann die obige Beschreibung in weitesten Umfang nutzen kann. Die

bevorzugten Ausführungsformen und Beispiele sind deswegen lediglich als beschreibende, keineswegs als in irgendeine Weise limitierende Offenbarung aufzufassen.

5 Die vollständige Offenbarung aller vor- und nachstehend aufgeführten Anmeldungen, Patente und Veröffentlichungen, sowie der korrespondierenden Anmeldung DE 198 05 431.9, eingereicht am 1.02.1998, sind durch Bezugnahme in diese Anmeldung eingeführt.

10

Beispiele

15 Im folgenden bedeutet Raumtemperatur eine Temperatur zwischen 15 und 30 °C. Die im folgenden in den Beispielen 1 und 2 benutzten Verweise beziehen sich auf Abbildung 1.

Beispiel 1: Bindung des ersten Monomerbausteines an Polyethylenglykol

20 Erste Stufe (Kopplungsreaktion): 10 g Methoxypolyethylenglykol (MeO-PEG-OH) mit einem mittleren Molekulargewicht von 5000 werden in 50 ml CH₂Cl₂ gelöst. Unter Rühren werden 1,2 g 1-Methyl-4-nitro-1H-pyrrol-2-carbonylchlorid (1) und 2 ml trockenes Pyridin zugefügt und die Mischung weitere 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung filtriert und das polymergebundene Produkt durch Zugabe von 800 ml Diethylether ausgefällt und abgefiltert. Das Produkt wird zweimal umgefällt und im Vakuum getrocknet, es kann mittels NMR-Spektroskopie analysiert werden.

25 30 Die Ausbeute ist quantitativ. 100 g MeO-PEG-OH binden ca. 2,5 g 1-Methyl-4-nitro-1H-pyrrol-2-carbonylchlorid.

Zweite Stufe (Reduktion): 5 g des Produktes (3) aus Stufe 1 werden mit 200 mg Pd/C (10 %) und 1 g Ammoniumformiat in 50 ml CH_2Cl_2 / Methanol (1:8; v:v) gemischt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Der

5 Katalysator wird abfiltriert und das Produkt durch Zugabe von 400 ml Diethylether ausgefällt und abfiltriert. Der erhaltene weiße Rückstand wird mit 25 ml CH_2Cl_2 behandelt, wobei das polymergebundene Produkt in Lösung geht und unverbrauchtes Ammoniumformiat zurückbleibt. Der Rückstand wird abfiltriert; die Lösung des polymergebundenen Produktes

10 (4) kann unmittelbar für die Kopplung der nächsten Monomereinheit verwendet werden.

Beispiel 2: Einführung von weiteren Monomerbausteinen

15 Stufe 1 (Kopplung): Die Lösung aus der zweiten Stufe von Beispiel 1 wird unter Rühren mit 570 mg 1-Methyl-4-nitro-1H-pyrrol-2-carbonylchlorid (1) und 1 ml trockenem Pyridin versetzt und die Mischung weitere 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung filtriert und das polymergebundene Produkt (6) durch Zugabe von 400 ml

20 Diethylether ausgefällt und abgefiltert. Das Produkt wird zweimal umgefällt und im Vakuum getrocknet, es kann mittels NMR-Spektroskopie analysiert werden. Die Ausbeute ist quantitativ.

Zweite Stufe (Reduktion): 5 g des Produktes (6) aus Stufe 1 werden mit 200 mg Pd/C (10 %) und 1 g Ammoniumformiat in 50 ml CH_2Cl_2 / Methanol (1:8; v:v) gemischt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Der Katalysator wird abfiltriert und das Produkt durch Zugabe von 400 ml

5 Diethylether ausgefällt und abfiltriert. Der erhaltene weiße Rückstand wird mit 25 ml CH_2Cl_2 behandelt, wobei das polymergebundene Produkt in Lösung geht und unverbrauchtes Ammoniumformiat zurückbleibt. Der Rückstand wird abfiltriert; die Lösung des polymergebundenen Produktes kann unmittelbar für die Kopplung der nächsten Monomereinheit verwendet

10 werden.

Der Zyklus aus Kopplungsreaktion und Reduktion kann mehrfach wiederholt werden.

15

Beispiel 3: Abspaltung des heteroaromatischen Oligoamids vom polymeren Träger

Sobald das Oligomere ((7); (8)) die gewünschte Kettenlänge erreicht hat, wird es durch Behandlung mit 2 N NaOH bei 50 °C (Dauer 6 Stunden)

20 hydrolytisch vom polymeren Träger abgespalten (Reaktion f)). Es entsteht die freie Carbonsäure des heteroaromatischen Oligoamids ((9); (10)). Die Ausbeute ist quantitativ.

25 **Beispiel 4: Weitere Umsetzungen an einem heteroaromatischen Oligoamid**

In einem nach den vorhergehenden Beispielen erhaltenen polymergebundenen heteroaromatischen Oligoamid wird die Nitrogruppe zur Aminogruppe reduziert und anschließend mit Glycin umgesetzt. Nach der

30 hydrolytischen Abspaltung vom polymeren Träger wird die Carboxylgruppe mit N,N-Dimethylpropylendiamin umgesetzt. Beispielhafte Reaktionsprodukte sind in Abbildung 3, Formel 3-15, dargestellt.

In Abbildung 3, Formel 3-15, bedeuten:

n 1, 2 oder 3;
X -CH= oder -N=.

5

Beispiel 5: Bindung eines heteroaromatischen Oligoamids an einen azlacton-aktivierten Träger

2 g eines azlactonaktivierten Trägers (Fractogel® Azlacton; Art. Nr. 10 087; 10 Merck KGaA) werden in einer Lösung von 150 mM NaCl in 40 ml Phosphatpuffer pH 7,0 suspendiert und 100 mg eines nach Beispiel 4 erhaltenen derivatisierten heteroaromatischen Oligoamides (n=1; X= -CH=) unter Rühren zugefügt und über Nacht bei Raumtemperatur weiter gerührt. Das erhaltene Produkt wird abfiltriert. Überschüssige Azlactongruppen 15 werden durch Reaktion mit 0,2 M Glycin in Tris-Puffer (pH 8,0) bei 40 °C (2 Stunden) inaktiviert. Das Produkt wird abgesaugt und mit Phosphatpuffer pH 7 gewaschen.

20 Es resultiert ein chromatographisches Trennmaterial, das als Separations- effektor ein derivatisiertes heteroaromatisches Oligoamid enthält.

Beispiel 6: Bindung eines heteroaromatischen Oligoamids an einen epoxy-aktivierten Träger

25 2 g eines epoxyaktivierten Trägers (Fractogel® Epoxy; Art. Nr. 16 279; Merck KGaA) werden in einer Lösung von 150 mM NaCl in 40 ml Phosphatpuffer pH 7,0 suspendiert und 100 mg eines nach Beispiel 4 erhaltenen derivatisierten heteroaromatischen Oligoamides (n=1; X= -CH=) unter Rühren zugefügt und 72 Stunden bei 40 °C weiter gerührt. Das 30 erhaltene Produkt wird abfiltriert. Überschüssige Epoxygruppen werden durch Reaktion mit 0,2 M Glycin in Tris-Puffer (pH 8,0) bei 40 °C (2

Stunden) inaktiviert. Das Produkt wird abgesaugt und mit Carbonatpuffer pH 10 gewaschen.

Es resultiert ein chromatographisches Trennmaterial, das als Separations-
5 effektor ein derivatisiertes heteroaromatisches Oligoamid enthält.

10

15

20

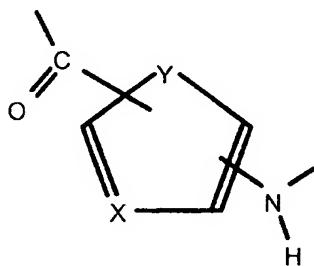
25

30

Ansprüche

1. Chromatographisches Trennmaterial für die Trennung von Nuklein-
säuren umfassend einen Basisträger und einen Affinitätsliganden, dadurch
5 gekennzeichnet, daß der Affinitätsligand einen heteroaromatischen Rest
der Formel I in Amidbindung enthält,

10



I

15

worin

X -CH= oder -N=

und

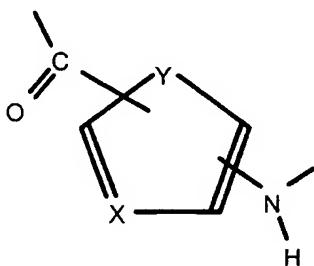
Y -NCH₃- oder -O-

bedeuten.

20

2. Verfahren zur Herstellung von heteroaromatischen Oligoamiden, die
einen heteroaromatischen Rest der Formel I in Amidbindung enthalten,

25



I

30

worin

X -CH= oder -N=

und

Y -NCH₃- oder -O-

5 bedeuten, gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:

- a) Bindung einer heteroaromatischen Nitrocarbonsäureeinheit an einen polymeren Träger, wobei die erzeugte Bindung unter Bedingungen gespalten werden kann, bei denen Amidbindungen intakt bleiben;
- 10 b) Reduktion der Nitrogruppe der an den polymeren Träger gebundenen heteroaromatischen Nitrocarbonsäure zu einer Aminogruppe;
- c) Bindung einer weiteren heteroaromatischen Nitrocarbonsäureeinheit an die in Schritt b) entstandenen Aminogruppe, wobei dieselbe heteroaromatische Nitrocarbonsäureeinheit wie im Schritt a) oder eine heteroaromatische Nitrocarbonsäureeinheit mit anderer Struktur 15 eingeführt wird;
- d) Wiederholung der Schritte b) und c) bis die gewünschte Kettenlänge und Sequenz erzielt ist;
- 20 e) optionale Derivatisierung der zuletzt eingeführten Nitro- oder Aminogruppe;
- f) Ablösung des heteroaromatischen Oligoamids vom polymeren Träger;
- g) optionale Umsetzung der in Schritt f) entstandenen Carboxylgruppe.

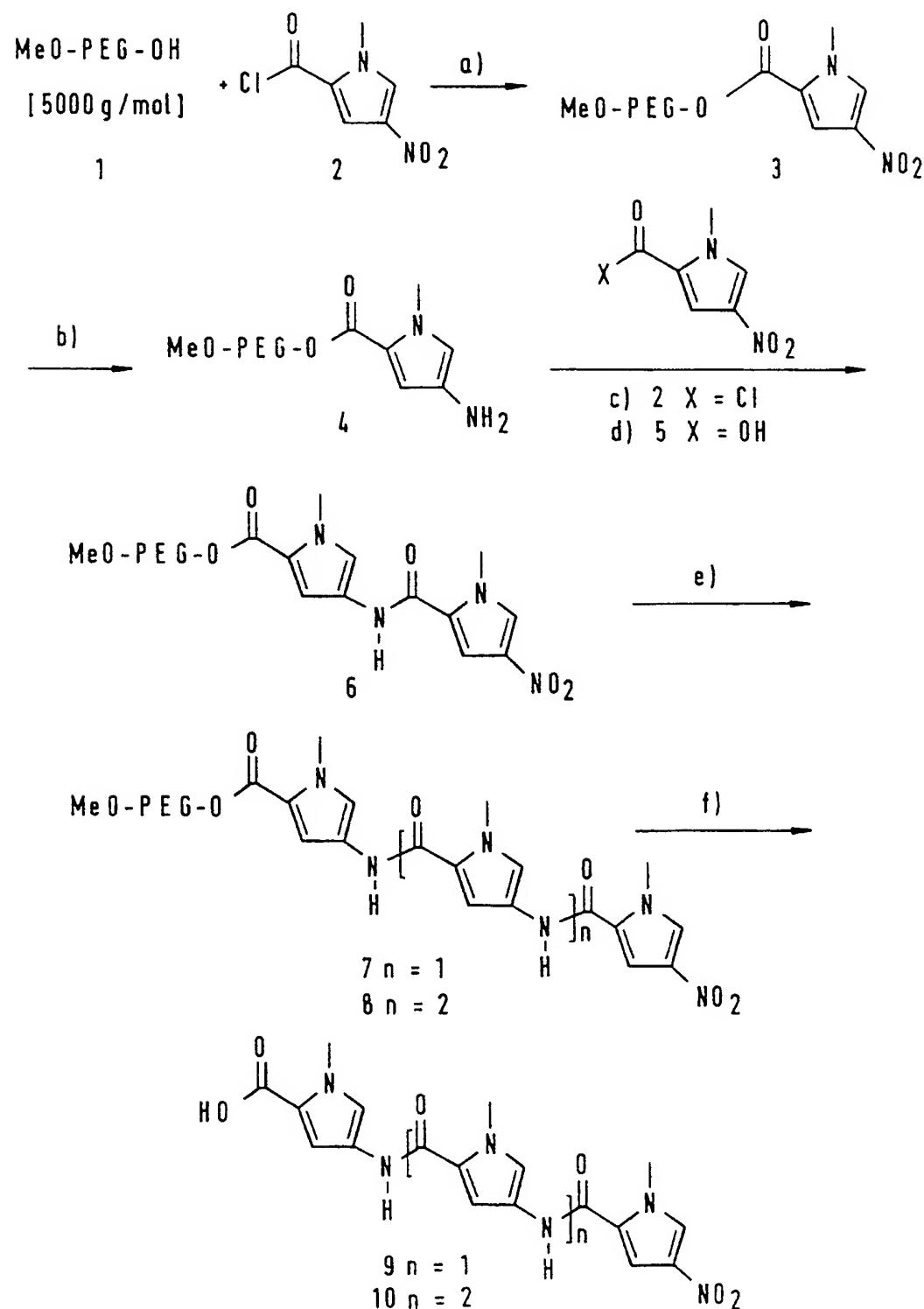
3. Verwendung eines chromatographischen Trennmaterials nach Anspruch 1 für die Trennung von Nukleinsäuren.

25

30

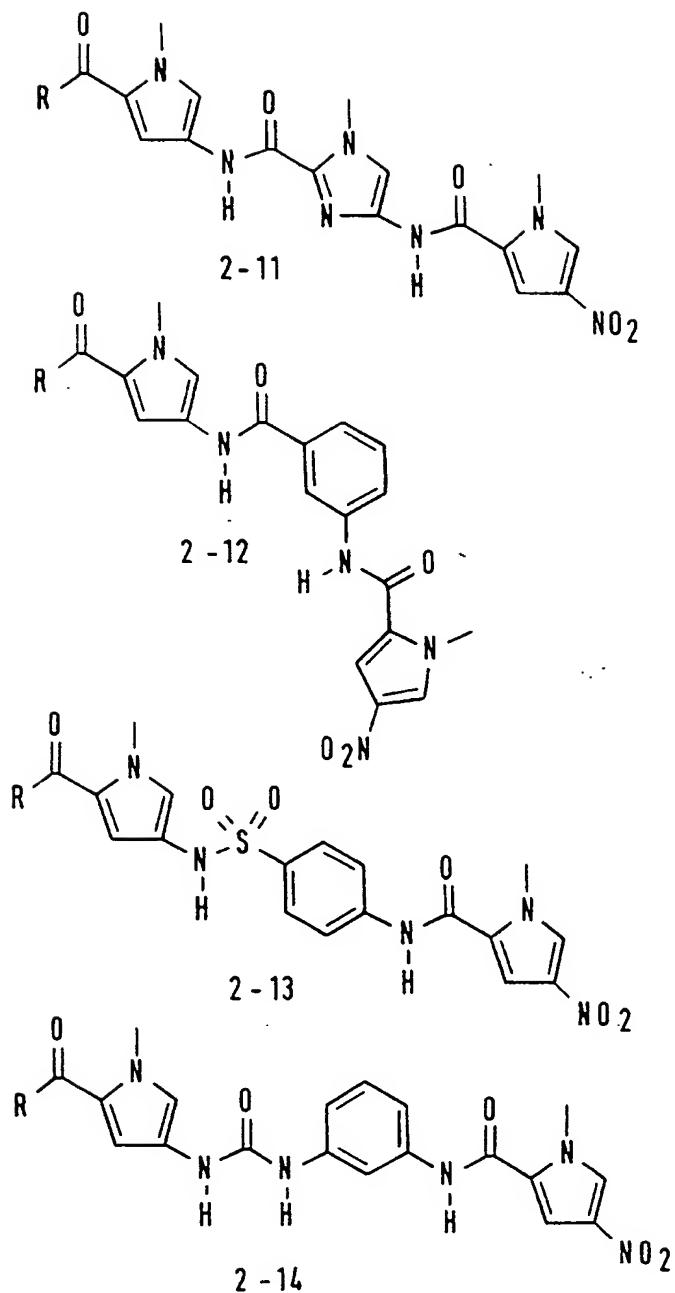
1/4

Fig.1



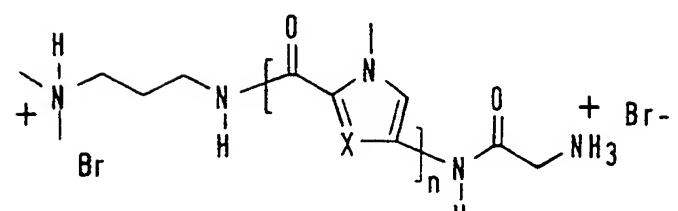
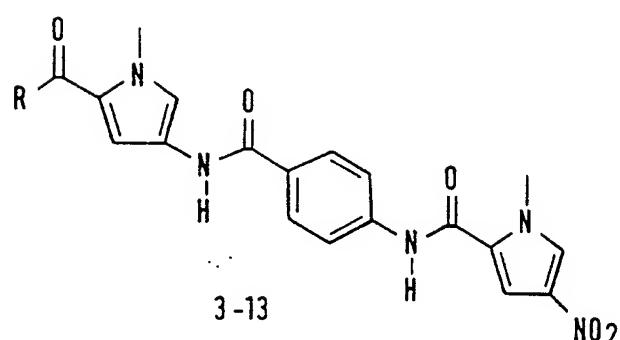
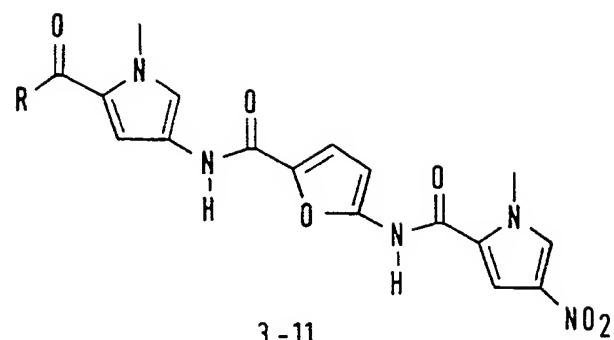
2/4

Fig.2

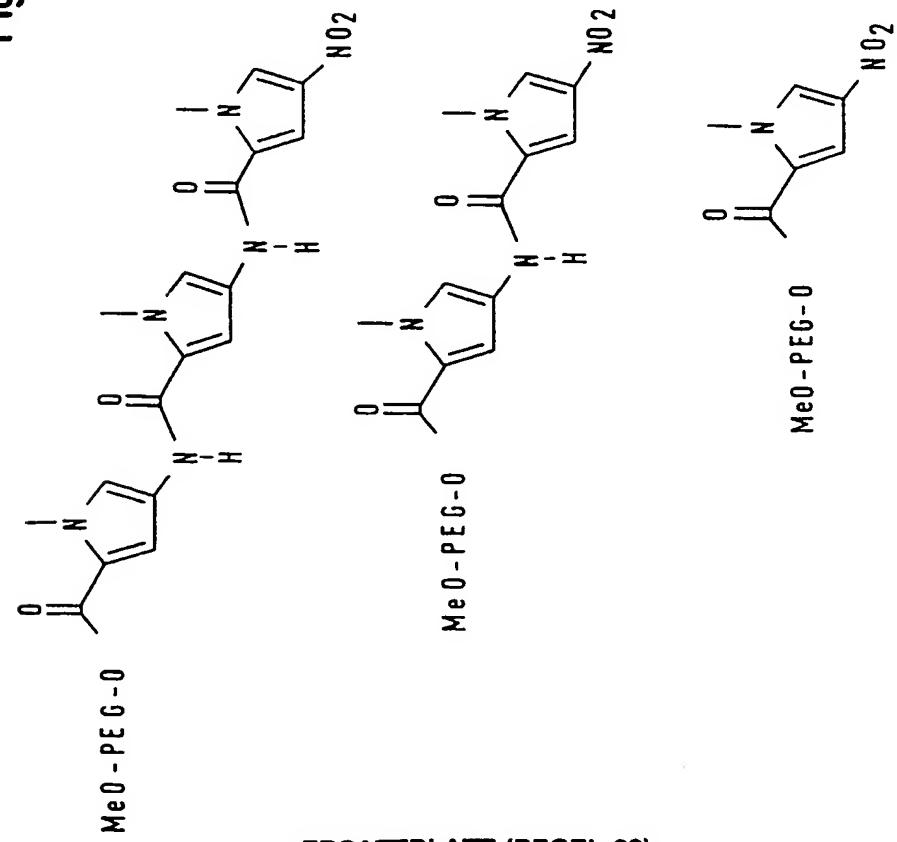
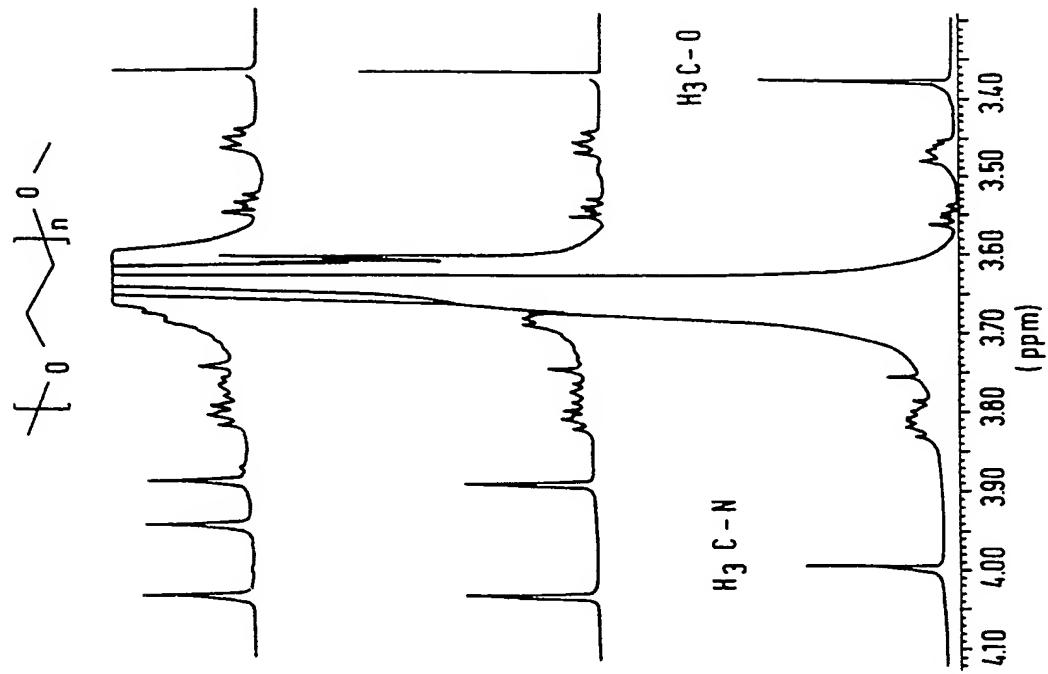


3/4

Fig.3



4/4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/00580

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/10 C07D207/42 C07D207/34 B01D15/08 C07H21/00
C07H1/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07D B01D C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>E E BAIRD & P B DERVAN: "Solid phase synthesis of polyamides containing imidazole and pyrrole amino acids" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY.,, vol. 118, no. 26, July 1996, pages 6141-6146, XP000674666 DC US cited in the application see the whole document</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	2

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 June 1999

Date of mailing of the international search report

06/07/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intell. Jnl Application No
PCT/EP 99/00580

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>F A ARCAMONE ET AL.: "Synthesis, DNA-binding properties, and antitumor activity of novel distamycin derivatives" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY., vol. 32, no. 4, April 1989, pages 774-778, XP000608784 WASHINGTON US see the whole document</p> <p>---</p>	2
X	<p>M E PARKS ET AL.: "Optimization of the hairpin polyamide design for recognition of the minor groove of DNA" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY., vol. 118, no. 26, July 1996, pages 6147-6152, XP000674668 DC US see the whole document</p> <p>---</p>	2
X	<p>GB 2 178 037 A (FARMITALIA) 4 February 1987 see the whole document</p> <p>---</p>	2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Application No

PCT/EP 99/00580

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
GB 2178037	A 04-02-1987	AT	386822 B	25-10-1988
		AT	188786 A	15-03-1988
		AU	584723 B	01-06-1989
		AU	6020386 A	22-01-1987
		BE	905109 A	15-01-1987
		CA	1247627 A	27-12-1988
		CH	671958 A	13-10-1989
		CN	1026984 B	14-12-1994
		CS	8605411 A	16-09-1992
		DE	3623853 A	29-01-1987
		DK	335886 A	17-01-1987
		FI	862960 A, B,	17-01-1987
		FR	2585019 A	23-01-1987
		GR	861840 A	18-11-1986
		IE	59275 B	09-02-1994
		JP	2047860 C	25-04-1996
		JP	7080842 B	30-08-1995
		JP	62030755 A	09-02-1987
		KR	9403495 B	23-04-1994
		NL	8601838 A	16-02-1987
		PH	23459 A	07-08-1989
		PT	82985 A, B	01-08-1986
		SE	468594 B	15-02-1993
		SE	8603099 A	17-01-1987
		SU	1535378 A	07-01-1990
		SU	1538893 A	23-01-1990
		US	4738980 A	19-04-1988

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/00580

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 6 C12N15/10 C07D207/42 C07D207/34 B01D15/08 C07H21/00
 C07H1/08

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07D B01D C07H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>E E BAIRD & P B DERVAN: "Solid phase synthesis of polyamides containing imidazole and pyrrole amino acids" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY., Bd. 118, Nr. 26, Juli 1996, Seiten 6141-6146, XP000674666 DC US in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument</p> <p>----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	2

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

^a Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,

eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

29. Juni 1999

06/07/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Masturzo, P

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/00580

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	F A ARCAMONE ET AL.: "Synthesis, DNA-binding properties, and antitumor activity of novel distamycin derivatives" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY., Bd. 32, Nr. 4, April 1989, Seiten 774-778, XP000608784 WASHINGTON US siehe das ganze Dokument ---	2
X	M E PARKS ET AL.: "Optimization of the hairpin polyamide design for recognition of the minor groove of DNA" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY., Bd. 118, Nr. 26, Juli 1996, Seiten 6147-6152, XP000674668 DC US siehe das ganze Dokument ---	2
X	GB 2 178 037 A (FARITALIA) 4. Februar 1987 siehe das ganze Dokument -----	2

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/00580

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
GB 2178037	A 04-02-1987	AT	386822 B	25-10-1988
		AT	188786 A	15-03-1988
		AU	584723 B	01-06-1989
		AU	6020386 A	22-01-1987
		BE	905109 A	15-01-1987
		CA	1247627 A	27-12-1988
		CH	671958 A	13-10-1989
		CN	1026984 B	14-12-1994
		CS	8605411 A	16-09-1992
		DE	3623853 A	29-01-1987
		DK	335886 A	17-01-1987
		FI	862960 A, B,	17-01-1987
		FR	2585019 A	23-01-1987
		GR	861840 A	18-11-1986
		IE	59275 B	09-02-1994
		JP	2047860 C	25-04-1996
		JP	7080842 B	30-08-1995
		JP	62030755 A	09-02-1987
		KR	9403495 B	23-04-1994
		NL	8601838 A	16-02-1987
		PH	23459 A	07-08-1989
		PT	82985 A, B	01-08-1986
		SE	468594 B	15-02-1993
		SE	8603099 A	17-01-1987
		SU	1535378 A	07-01-1990
		SU	1538893 A	23-01-1990
		US	4738980 A	19-04-1988

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)